

## بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs7192 ژن HLA-DRA با ناباروری مردان در استان اصفهان

مجید متولی باشی<sup>۱\*</sup>، صالحه اکبری<sup>۲</sup>، سید مرتضی جوادی راد<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران؛ <sup>۲</sup>دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۵

### چکیده:

زمینه و هدف: یک سوم موارد مردانه مرتبط با ناباروری ناشناخته بوده و پیش بینی شده است که اغلب موارد ناشناخته ناباروری بر اساس یک نقص ژنتیکی استوار باشد. از طرفی، اخیراً تأثیر ژن های HLA بر روی اسپرماتوژنز در مردان نابارور نشان داده شده است. لذا در این مطالعه ما به ارزیابی ارتباط چندشکلی rs7192 ژن HLA-DRA بر ناباروری مردان در جمعیت استان اصفهان پرداخته ایم.

روش بررسی: ۱۰۰ مرد نابارور مبتلا به آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید به عنوان گروه بیمار و تعداد متناظر مرد بارور به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. DNA ژنومی خون محیطی این افراد، بعد از دریافت رضایت نامه کتبی گرفته شد. با استفاده از تکنیک ARMS-PCR، چندشکلی rs7192 در هر دو گروه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بر اساس نتایج این مطالعه، با اینکه فراوانی آلل G در افراد نابارور بیشتر از آلل T بود؛ ولی از این نظر، بین دو گروه بیمار و سالم تفاوت معنی داری وجود نداشت ( $P=0/47$  و  $OR=0/86$ ). با این وجود، هموزیگوت های GG نسبت به هموزیگوت های TT افزایش خطر ناباروری را نشان می دهند که البته معنی دار گزارش نمی شود ( $P=0/40$  و  $OR=1/47$ ). مقایسه ژنوتیپ های GG + GT نسبت به هموزیگوت های TT نیز با وجود افزایش خطر ناباروری، نتوانست از لحاظ آماری ارتباط معنی داری بین دو گروه مردان نابارور و سالم نشان دهد ( $P=0/4$  و  $OR=1/43$ ).

نتیجه گیری: بررسی ارتباط چندشکلی rs7192 در جمعیت مردان استان اصفهان، ارتباط معنی داری با ناباروری در مردان با آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید نشان نداد.

واژه های کلیدی: ناباروری مردان، ژن HLA-DRA، چندشکلی rs7192.

### مقدمه:

بروز ناباروری مردانه می تواند به دلیل عوامل اولیه یا ثانویه باشد؛ ولی در موارد زیادی از ناباروری های مرتبط با اختلال در اسپرم زایی (حدود ۳۰٪ مردانی اولیگواسپرم یا آزواسپرم)، دلایل شناخته شده ای وجود ندارد و ناباروری تک گیر (Idiopathic) تشخیص داده می شود (۳). در اغلب موارد ناباروری ایدیوپاتیک یک ناهنجاری ژنتیکی به ویژه در سطح مولکولی اتفاق می افتد و از آنجایی که تعیین علت و درمان ناباروری می تواند موجب تداوم یک زندگی مشترک و آرامش

ناباروری به معنی عدم توانایی زوجین در بارداری بعد از یک سال رابطه جنسی و بدون استفاده از عوامل بازدارنده بوده و به عنوان یکی از معضلات مهم زندگی بشری موجب گسیختگی زوج ها و مشکلات و عوارض بعدی در زندگی اجتماعی می گردد (۱). علت انحصاری تقریباً ۲۰٪ موارد ناباروری زوج ها وجود اختلالاتی در مردان است و در ۲۰-۴۰٪ دیگر زوج هایی که دچار نارسایی تولیدمثل هستند، عامل مردانه عامل دخالت کننده مهمی محسوب می شود (۲).

روحي خانواده‌ها گردد، شناسایی عوامل ژنتیکی باعث مدیریت مناسب زوج‌های نابارور خواهد شد (۴).

ژن HLA-DRA یکی از ژن‌های کلاس دو مجموعه اصلی سازگاری بافتی (MHC II) است که در موقعیت کروموزومی 6p21.32 قرار داشته و اولین بار در سال ۱۹۸۲ کلون شد (۵، ۶). مطالعات گسترده نشان داد که آلل‌های ژن HLA-DRA می‌توانند در ارتباط با بروز بیماری ام‌اس، دیابت حاملگی، سندرم Sjogren و استعداد ابتلا به هپاتیت B باشند (۱۳-۷). مطالعات دیگر نشان داد که ژن‌های MHC II بر سطح سلول‌های لایه زایا و همچنین اسپرماتوزوآ بیان شده و در طول اسپرماتوزنز هم در موش و هم در انسان بیان می‌شوند (۱۴، ۱۵)؛ بنابراین بیان مولکول‌های کلاس دو بر روی سلول‌های اسپرم ممکن است، در فرایند باروری نقش داشته باشند؛ چنانچه مشخص شده است، افزایش فراوانی بعضی از آلل‌های کلاس دو با ناباروری در مردان ارتباط دارد (۱۵). این مطالعات نشان می‌دهند که حمل آلل‌های پرخطر، به‌عنوان یک فاکتور اضافی در بروز اسپرماتوزنز معیوب مطرح باشد (۱۵). لازم به ذکر است که همین آلل‌های پرخطر، در مردان سالم نیز دیده می‌شوند ولی فراوانی بسیار پایین تری دارند.

مطالعات اخیر نشان داده است که چندشکلی ژن‌های کروموزوم‌های اتوزوم نیز نقش مهمی در ناباروری مردان بازی کرده و مجموعه HLA به‌عنوان یک سیستم ژنتیکی بالاترین میزان چندشکلی در ژنوم انسان شناخته می‌شود (۱۶). در همین ارتباط مطالعاتی به ترتیب در جمعیت چین و ژاپن نشان دادند که rs3129878 واقع در اینترون شماره ۱ ژن HLA-DRA با آزواسپرمی غیر انسدادی در مردان همراهی قوی دارد (۱۷، ۱۸).

با توجه به بیان ژن‌های HLA بر روی اسپرماتوزوآ انسانی و با توجه به نقش مولکول‌های HLA-DRA در بروز ناباروری در دو جمعیت چین و ژاپن انتظار می‌رود که چندشکلی‌های ژن‌های HLA کلاس دو با ناباروری مردان ارتباط داشته باشند.

از آنجایی که چندشکلی‌های ژن HLA-DRA و ارتباط آن با ناباروری در مردان ایران بررسی نشده است، این پژوهش با هدف مطالعه فراوانی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) rs7192 ژن HLA-DRA طراحی شده است تا ارتباط احتمالی این جایگاه با ناباروری در مردان اصفهان مشخص گردد.

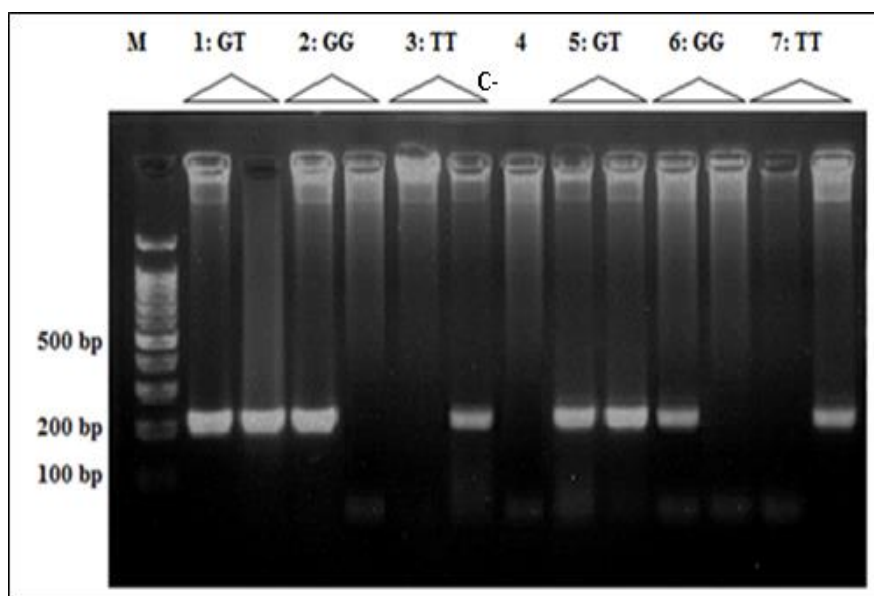
### روش بررسی:

مطالعه حاضر از نوع مورد-شاهدی بوده و شامل ۱۰۰ مرد نابارور از نوع آزواسپرمی و یا لیگوزواسپرمی و ۱۰۰ مرد بارور که حداقل یک فرزند طبیعی داشته باشند، می‌باشد. افراد سالم علاوه بر باروری طبیعی (طبق اظهارات خود فرد) بایستی از مصرف الکل، مواد مخدر و داروهای روانگردان خودداری کرده باشند و از نظر سنی با گروه بیمار مطابقت داشته باشند. محدوده سنی افراد مورد مطالعه بین ۲۰ تا ۶۰ سال ( $40 \pm 20$ ) بوده و نمونه‌های بیمار از مرکز ناباروری اصفهان (IFIC) و نمونه‌های سالم از بین مراجعه‌کنندگان بررسی سلامت سالیانه بیمارستان الزهراء اصفهان انتخاب شدند.

برای طراحی پرایمر جایگاه rs7192 مناسب برای ARMS-PCR، ابتدا توالی ژن HLA-DRA از بانک اطلاعاتی Gene سایت NCBI استخراج شد و جایگاه rs7192 در توالی ژن مذکور (موقعیت ۸۳۳ مولکول mRNA با عدد دسترسی NM\_019111.4) مشخص گردید. بعد از طراحی پرایمرهای مناسب تکنیک ARMS-PCR به کمک نرم‌افزار آنلاین PRIMER1، دمای اتصال پرایمرهای پیشرو، پیرو A و پیرو C به ترتیب ۵۷/۷، ۵۷/۱ و ۵۶/۶ درجه سلسیوس تعیین شد. سپس پرایمرهای طراحی‌شده توسط نرم‌افزار Oligo 7.1، از نظر تشکیل دایمر و اتصال غیراختصاصی، کنترل شده و به‌منظور بررسی اختصاصیت و عدم اتصال به سایر قسمت‌های ژنوم، NCBI-PrimerBLAST انجام شد. با توجه به اینکه طول محصول PCR حاصل از بکارگیری پرایمر پیشرو و هریک از پرایمرهای اختصاصی پیرو معادل ۲۰۶ جفت باز بود، برای هر نمونه دو واکنش مجزای

شد و این فرد هموزیگوت با ژنوتیپ TT تشخیص داده شد (تصویر شماره ۱). در نهایت، هتروزیگوت های GT کسانی بودند که در هر دو تیوب حاوی هر دو پرایمر مختص آلل G و T تکثیر نشان می دادند (نمونه شماره ۱ و ۵، تصویر شماره ۱).

تکثیر انجام شد (تصویر شماره ۱). پلیمریزاسیون پرایمر مختص آلل G و نه آلل T در نمونه شماره ۲ و ۶ انجام شد و این فرد برای آلل G هموزیگوت معرفی شد (تصویر شماره ۱). از طرف دیگر، پلیمریزاسیون پرایمر مختص آلل T و نه آلل G در نمونه شماره ۳ و ۷ انجام



**تصویر شماره ۱: الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه**

ردیف ۱ تا ۳ مربوط به افراد بیمار و ردیف ۵ تا ۷ مربوط به افراد سالم می باشد؛ ردیف ۴ مربوط به کنترل منفی (C-) می باشد؛ M مارکر Gene Ruler 100bp DNA Plus با عدد کاتالوگ SM0321 شرکت ترموفیشر ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)) می باشد.

آلل G به صورت CTGCATTGCTTTTTCGTAC بود. لازم به ذکر است که در تکنیک ARMS-PCR از تکثیر اختصاصی آلل ها به کمک ماشین PCR برای تشخیص موتاسیون های نقطه ای استفاده می شود. این تکنیک بر پایه تفاوت نوکلئوتید انتهایی ۳ پرایمرهایی است که برای آلل های مختلف طراحی شده و این حالت اختصاصیت پرایمرها، به کمک تکثیر در دو لوله جداگانه مشخص می کند که هر فرد بسته به نوع ژنوتیپ مربوطه هموزیگوت یا هتروزیگوت است. در این مطالعه، فراوانی آللی و فراوانی ژنوتیپی و بررسی تعادل هاردی واینبرگ به کمک نرم افزار Power Marker محاسبه و ارزیابی شدند. وجود تعادل هاردی واینبرگ از طریق محاسبه مقدار P مورد بررسی قرار گرفت و مقادیر P کوچک تر ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شدند. نرم افزار Power Marker بر اساس آزمون

استخراج DNA ژنومی از خون تام افراد مورد مطالعه به کمک روش رسوب نمکی انجام شد و برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بکار گرفته شد (۱۹). پرایمرهای اختصاصی (برای ژن با عدد دسترسی NM\_019111.4) برای آلل توسط برنامه آنالین PRIMER1 طراحی شده و سپس توسط نرم افزار OLIGO7 از نظر دمای اتصال و تشکیل دایمر کنترل شدند. به منظور بررسی اختصاصیت و عدم اتصال آن به قسمت های دیگر ژنوم، از نرم افزار تحت وب BLAST سایت NCBI استفاده شد و در نهایت پرایمرهای مخصوص تکنیک ARMS-PCR توسط شرکت سیناژن ایران ساخته شدند. توالی پرایمر پیشرو GAACCCTACATTTTGATTCTGAGTG و توالی پرایمر پیرو مختص آلل T به صورت CTGCATTGCTTTTTCGTAA و پرایمر پیرو مختص

دقیق فیشر به بررسی تعادل هاردی واینبرگ می‌پردازد. نسبت های احتمالات (OR) با فاصله ی اطمینان ۹۵٪ (CI=۹۵٪) برای سنجش همبستگی های بین آلل ها و ژنوتیپ های خاص و خطر ناباروری محاسبه شدند.

### یافته ها:

برای تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی افراد بر اساس چندشکلی rs7192، بر اساس نتایج ARMS-PCR، فراوانی آلل G در افراد نابارور و بارور به ترتیب ۶۴/۵٪ و ۶۱٪ و همچنین فراوانی آلل T در این افراد به ترتیب ۳۳/۵٪ و ۳۹٪ به دست آمد (جدول شماره ۱). در بررسی میزان فراوانی آلل های G و T در دو گروه مردان نابارور و افراد شاهد، فراوانی آللی بین دو گروه بیمار و سالم تفاوت فراوانی نداشت (OR=۰/۸۶) و مقدار P برابر با ۰/۴۷ نشان داد که ارتباط آماری معنی داری بین دو گروه مورد مقایسه وجود ندارد (جدول شماره ۱). همچنین

بررسی فراوانی ژنوتیپ های چندشکلی rs7192 نشان داد که از بین ۱۰۰ مرد نابارور مورد بررسی، ۴۰ نفر ژنوتیپ GG (۴۰٪)، ۴۹ نفر ژنوتیپ GT (۴۹٪) و ۱۱ نفر ژنوتیپ TT (۱۱٪) را دارا هستند (جدول شماره ۱). مقایسه فراوانی ژنوتیپ ها در ۱۰۰ مرد بارور مورد بررسی نشان داد که ۳۷ نفر ژنوتیپ GG (۳۷٪)، ۴۸ نفر ژنوتیپ GT (۴۸٪) و ۱۵ نفر ژنوتیپ TT (۱۵٪) را دارا هستند (جدول شماره ۱). بر اساس جدول شماره ۱، ژنوتیپ های دارای آلل G نسبت به ژنوتیپ فاقد آن آلل، در گروه های مورد مطالعه مقایسه شدند و مشخص گردید که هموزیگوت های GG نسبت به هموزیگوت های TT ارتباط معنی داری در ناباروری نشان نمی دهند (P=۰/۴۰ و OR=۱/۴۷). همچنین بر اساس نتایج جدول شماره ۱، مقایسه ژنوتیپ های GT + GG نسبت به ژنوتیپ TT نیز نتوانست از لحاظ آماری، ارتباط معنی داری بین دو گروه مردان نابارور و سالم نشان دهد (P=۰/۴۰ و OR=۱/۴۳).

**جدول شماره ۱: توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی چندشکلی rs7192 در دو گروه مردان نابارور و افراد شاهد**

فرم ماده ژنتیکی	مردان نابارور	افراد شاهد	P	OR (CI=۹۵٪)	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)			
آلل G	۱۲۹ (۶۴/۵)	۱۲۲ (۶۱)	۰/۴۷	۰/۸۶ (۰/۵۷-۱/۲۹)	ژنوتیپ
T	۷۱ (۳۳/۵)	۷۸ (۳۹)			
GG	۴۰ (۴۰)	۳۷ (۳۷)	a=۰/۴	a=۱/۴۷ (۰/۶۰-۳/۶۲)	ژنوتیپ
GT	۴۹ (۴۹)	۴۸ (۴۸)	b=۰/۴	b=۱/۴۳ (۰/۶۲-۳/۲۸)	
TT	۱۱ (۱۱)	۱۵ (۱۵)			

a ژنوتیپ GG در مقایسه با ژنوتیپ TT؛ b ژنوتیپ GT + GG در مقایسه با ژنوتیپ TT.

### بحث:

بررسی ارتباط چندشکلی های لوکوس ژنی HLA-DRA با بیماری نقص سیستم ایمنی لوپوس اریتروماتوز سیستمیک (SLE) نشان داد که ترکیب

بررسی ارتباط چندشکلی های مشخصی از HLA-DR2\3 در تولید آنتی بادی های ضد سیستم ایمنی خودی تعیین کننده بوده و استعداد ابتلا به SLE را افزایش چشمگیری می دهند (۲۰).

از طرف دیگر، بررسی کروموزوم های حامل هاپلوتیپ های یکسان جایگاه ژنی HLA-DRB1-DQA1-DQB1 نشان داد که تعدادی از SNP های موجود در این نواحی به طور معنی داری با استعداد ابتلا به دیابت تیپ ۱ در ارتباط هستند (۲۱). همچنین مطالعات متعددی برای بررسی ارتباط چندشکلی جایگاه ژنی HLA-DRA با بیماری های سارکوئیدوز (Sarcoidosis)، سوریاسیس و بچت (Psoriasis and Behcet)، سرطان خون از نوع Non-hodgkin Lymphoma، روماتوئید ارتریتیس (Rheumatoid arthritis) و آسم انجام شده است که نتایج متفاوتی را در برداشته است (۲۶-۲۲).

مطالعات بررسی رابطه ژن HLA-DRA و ناباروری در مردان با بررسی بیان پروتئین حاصل از این آنتی ژن ها بر روی اسپرم بالغ آغاز شد و دو مطالعه متناقض نتوانستند به صراحت حضور آنتی ژن های HLA را بر سطح سلول های اسپرماتوزوآ تأیید و یا رد کنند (۲۷، ۲۸). سپس Martin-Villa و همکاران ارتباط بیان دیپلوئید مولکول های HLA کلاس I و II بر سطح سلول های اسپرم با غلظت Inhibin را نشان دادند (۲۹). سپس مشخص شد که مردان با اسپرماتوژنز نرمال و مردان با پارامترهای کاهش یافته مایع منی، تفاوت های مهمی در آلل های HLA کلاس II خود نشان داده و همچنین، تفاوت های قابل توجهی بین مردان با اسپرماتوژنز نرمال و مردان با فاکتور ناباروری مردانه از نظر فراوانی هاپلوتایپ های مذکور وجود دارد (۱۵). اولین بررسی ارتباط چندشکلی های موقعیت ژنی HLA-DRA با آزواسپرمی غیر انسدادی در جمعیت چین انجام شد و نشان داد که ژن مذکور نمی تواند در ارتباط با استعداد ابتلا به ناباروری مردانه از نوع تک گیر باشد (۳۰). سپس در مطالعه دیگری در جمعیت چین مشخص گردید که تنوعات درون ناحیه ژنی HLA-DRA ممکن است بتوانند با خطر آزواسپرمی غیر انسدادی در ارتباط باشند (۱۷). در مطالعه مذکور، بیش از ۹۱۲۰۰۰ نقطه دارای SNP بررسی شده و در نهایت ۳۷ SNP انتخاب شدند که

به طور مستقل با آزواسپرمی غیر انسدادی در ارتباط بودند (۱۷). از بین ۳۷ SNP انتخاب شده، تنها ۴ جایگاه rs3129878، rs498422، rs2076531 و rs7192 با مقدار P کمتر از ۰/۰۰۱ با بروز آزواسپرمی غیر انسدادی در ارتباط بودند (۱۷). دو مطالعه نیز در مورد ارتباط چندشکلی های ژنتیکی با بروز ناباروری در ایران انجام شده است (۳۱، ۳۲). در اولین مطالعه، ارتباط بین چندشکلی ژن HLA-G با بروز نقص در انتقال جنین به وسیله روش های کمک باروری (ART) مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که تنوعات آللی در اگزون های ۳ و ۴ ژن مذکور می توانند منجر به بروز سقط جنین کاشته شده شوند (۳۲). در مطالعه دوم ارتباط بین ژن HLA-E و بروز ناباروری در زنان ایرانی بررسی شد و مشخص گردید که ژنوتیپ HLA-E 0101/0103 می تواند در ارتباط با بروز سقط مکرر باشد (۳۱).

در مطالعه حاضر و به کمک روش ARMS-PCR به بررسی چندشکلی rs7192 در جمعیت مردان ایران پرداخته شده است. نتایج بررسی فراوانی ژنوتیپ های هموزیگوس نشان داد که هرچند فراوانی افراد GG در گروه بیمار ۳٪ بیشتر از افراد کنترل می باشد (۴۰٪)؛ اما فراوانی ژنوتیپ TT در افراد بیمار ۴٪ کمتر از افراد کنترل (۱۱٪) می باشد. این مسئله نشان می دهد که یک تفاوت در میزان بروز آلل های G و T در بین افراد نابارور و بارور وجود دارد و از طرف دیگر، فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت GT در افراد بیمار و کنترل تفاوتی نشان نمی دهد (جدول شماره ۱). بر همین اساس آلل G در افراد بیمار ۳/۵٪ فراوان تر بوده (۶۴/۵٪ نسبت به ۶۱٪) و آلل T در افراد بیمار ۵/۵٪ کمتر مشاهده شده است (جدول شماره ۱)؛ بنابراین به نظر می رسد که آلل G بتواند در ارتباط با ناباروری در مردان اصفهانی باشد؛ اما نتایج بررسی های آماری نشان داد که علی رغم فراوانی بیشتر این آلل در مردان نابارور نسبت به افراد سالم، این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار (P=۰/۴۷ و OR=۰/۸۶) نیست. از طرف دیگر مقایسه ژنوتیپ های ۳ گانه نیز نشان داد که افراد هموزیگوت GG

### نتیجه گیری:

بررسی ارتباط چندشکلی rs7192 در جمعیت مردان استان اصفهان، ارتباط معنی داری با ناباروری در مردان با آزواسپرمی یا الیگواسپرمی شدید نشان نداد.

### تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم عاطفه اکبری به شماره BIO 616 می باشد که در تاریخ مهرماه سال ۱۳۹۴ در دانشگاه اصفهان به اتمام رسیده است. از معاونین محترم پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان تشکر و قدردانی می شود. همچنین از افراد نابارور و بارور شرکت کننده و کارکنان بیمارستان الزهرا اصفهان به دلیل همکاری در جمع آوری نمونه تقدیر و تشکر به عمل می آید.

نه به تنهایی ( $P=0/40$  و  $OR=1/47$ ) و نه به همراه افراد هتروزیگوت GT ( $P=0/40$  و  $OR=1/43$ )، نمی تواند موجب افزایش معنی دار ناباروری در مردان اصفهانی شوند (جدول شماره ۱).

بنابراین نتایج به دست آمده در این مطالعه در خصوص ارتباط چندشکلی rs7192 با ناباروری مردان در اصفهان، برخلاف نتایج Zhao و همکاران می باشد. از دلایل این ناهمبستگی می توان به اختلاف نژادی جمعیت های مورد مطالعه و دخالت سایر فاکتورهای ژنتیکی و محیطی ناشناخته در کنار چندشکلی مورد نظر اشاره کرد که بر اختلاف نتایج اثرگذار می باشند. در نتیجه انجام مطالعات وسیع تر در جمعیت های مختلف ایران می تواند در تأیید نتایج این پژوهش موثر واقع گردد.

### منابع:

1. Araoye MO. Epidemiology of infertility: Social problems of the infertile couples. West Afr J Med. 2003; 22(2): 190-6.
2. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. J Hum Reprod Sci. 2015; 8(4): 191-6.
3. Wu W, Shen O, Qin Y, Niu X, Lu C, Xia Y, et al. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). PloS one. 2010; 5(11): e13884.
4. Dabaja AA, Schlegel PN. Medical treatment of male infertility. Transl Androl Urol. 2014; 3(1): 9-16.
5. Lee JS, Trowsdale J, Bodmer WF. cDNA clones coding for the heavy chain of human HLA-DR antigen. Proc Natl Acad Sci. 1982; 79(2): 545-9.
6. Korman AJ, Knudsen PJ, Kaufman JF, Strominger JL. cDNA clones for the heavy chain of HLA-DR antigens obtained after immunopurification of polysomes by monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci. 1982; 79(6): 1844-8.
7. Bolstad AI, Wassmuth R, Haga H-J, Jonsson R. HLA markers and clinical characteristics in Caucasians with primary Sjogren's syndrome. J Rheumatol. 2001; 28(7): 1554-62.
8. Howson J, Roy M, Zeitels L, Stevens H, Todd J. HLA class II gene associations in African American Type 1 diabetes reveal a protective HLA-DRB1\*03 haplotype. Diabet Med. 2013; 30(6): 710-6.
9. Kim H, Lee TY, Kim E, Choi J, Kim S, Hwang YC, et al. Fulminant Type 1 diabetes in a pregnant woman as an initial manifestation of the insulin autoimmune syndrome. Diabet Med. 2012; 29(10): 1335-8.
10. Kovacs A, Endreffy E, Petri I, Kovacs L, Pokorny G. HLA class II allele polymorphism in Hungarian patients with primary Sjogren's syndrome. Scand J Rheumatol. 2006; 35(1): 75-6.
11. Lin X, Deng F-Y, Mo X-B, Wu L-F, Lei S-F. Functional relevance for multiple sclerosis-associated genetic variants. Immunogenetics. 2015; 67(1): 7-14.

12. Nakken B, Jonsson R, Brokstad K, Omholt K, Nerland A, Haga H, et al. Associations of MHC class II alleles in Norwegian primary Sjogren's syndrome patients: implications for development of autoantibodies to the Ro52 autoantigen. *Scand J Immunol*. 2001; 54(4): 428-33.
13. Yucesoy B, Talzhanov Y, Johnson VJ, Wilson NW, Biagini RE, Wang W, et al. Genetic variants within the MHC region are associated with immune responsiveness to childhood vaccinations. *Vaccine*. 2013; 31(46): 5381-91.
14. Höglstrand K, Böhme J. Gene conversion of major histocompatibility complex genes in the mouse spermatogenesis is a premeiotic event. *Mol Biol Cell*. 1997; 8(12): 2511-7.
15. Van der Ven K, Fimmers R, Engels G, Van der Ven H, Krebs D. Evidence for major histocompatibility complex-mediated effects on spermatogenesis in humans. *Hum Reprod*. 2000; 15(1): 189-96.
16. Nuti F, Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2008; 16(4): 504-13.
17. Zhao H, Xu J, Zhang H, Sun J, Sun Y, Wang Z, et al. A genome-wide association study reveals that variants within the HLA region are associated with risk for nonobstructive azoospermia. *Am J Hum Genet*. 2012; 90(5): 900-6.
18. Jinam TA, Nakaoka H, Hosomichi K, Mitsunaga S, Okada H, Tanaka A, et al. HLA-DPB1\*04: 01 allele is associated with non-obstructive azoospermia in Japanese patients. *Hum Genet*. 2013; 132(12): 1405-11.
19. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215.
20. Graham RR, Ortmann W, Rodine P, Espe K, Langefeld C, Lange E, et al. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *Eur J Hum Genet*. 2007; 15(8): 823.
21. McGinnis R, McLaren W, Ranganath V, Whittaker P, Hunt S, Deloukas P. Haplotype-based search for SNPs associated with differential type 1 diabetes risk among chromosomes carrying a specific HLA DRB1-DQA1-DQB1 haplotype. *Diabetes Obes Metab*. 2009; 11(s1): 8-16.
22. Adrianto I, Lin CP, Hale JJ, Levin AM, Datta I, Parker R, et al. Genome-wide association study of African and European Americans implicates multiple shared and ethnic specific loci in sarcoidosis susceptibility. *PloS one*. 2012; 7(8): e43907.
23. Cerhan JR, Fredericksen ZS, Novak AJ, Ansell SM, Kay NE, Liebow M, et al. A two-stage evaluation of genetic variation in immune and inflammation genes with risk of non-Hodgkin lymphoma identifies new susceptibility locus in 6p21. 3 region. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012; 21(10): 1799-806.
24. Lee YH, Bae S-C, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Genome-wide pathway analysis of genome-wide association studies on systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(12): 10627-35.
25. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Genome-wide pathway analysis of a genome-wide association study on psoriasis and Behcet's disease. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(5): 5953-9.
26. Song GG, Lee YH. Pathway analysis of genome-wide association study on asthma. *Hum Immunol*. 2013; 74(2): 256-60.
27. Arnaiz-Villena A, Taylor B, Festenstein H. The relationship between histocompatibility products and complement receptors [proceedings]. *Folia Biol*. 1976; 22(6): 379.
28. Bishara A, Oksenberg JR, Frankel G, Margalioth EI, Persitz E, Nelken D, et al. Human leukocyte antigens (HLA) class I and class II on sperm cells studied at the serological, cellular, and genomic levels. *Am J Reprod Immunol Microbiol*. 1987; 13(4): 97-103.

29. Martin-Villa JM, Luque I, Martinez-Quiles N, Corell A, Regueiro JR, Timon M, et al. Diploid expression of human leukocyte antigen class I and class II molecules on spermatozoa and their cyclic inverse correlation with inhibin concentration. *Biol Reprod.* 1996; 55(3): 620-9.
30. Zhou DX, Huang XC, Wang XF, Zhang J, Wang H, Tian Z. Association study of human leucocyte antigen-A gene with idiopathic male infertility in Han population of China. *Andrologia.* 2012; 44(s1): 213-8.
31. Fotoohi M, Ghasemi N, Mirghanizadeh SA, Vakili M, Samadi M. Association between HLA-E gene polymorphism and unexplained recurrent spontaneous abortion (RSA) in Iranian women. *Int J Reprod Biomed.* 2016; 14(7): 477-82.
32. Kuroshli Z, Gourabi H, Bazrgar M, Sanati MH, Esteki MZ. The relationship between HLA-G gene polymorphisms and repeated implantation failure in infertile couples undergoing assisted reproductive technique. *Iranian J Allergy, Asthma Immunol.* 2015; 14(5): 535-42.



## Association study of rs7192 polymorphism of HLA-DRA gene with male infertility occurrence in Isfahan province of Iran

Motovali-bashi M<sup>1\*</sup>, Akbari S<sup>2</sup>, Javadirad SM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran; <sup>2</sup>Student, Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 28/Dec/2016

Accepted: 13/Feb/2017

**Background and aims:** One third of male factors related to infertilities are basically unknown and it has been predicted to be most of the unknown infertilities based on genetic abnormalities. On the other hands, the effect of HLA-DRA genes on spermatogenesis has been shown recently. So, this study was aimed to assess the association of rs7192 polymorphic site of HLA-DRA gene on male infertility in Isfahan province of Iran.

**Methods:** 100 infertile men with azoospermia or severe oligozoospermia as case group and equal numbers of fertile men as control individuals were selected. Genomic DNA of peripheral blood was extracted after the written consent was taken. rs7192 polymorphic site has been analyzed by ARMS-PCR method in the case and control groups.

**Results:** According to the results, the frequency of G allele was higher in infertile men than the T allele; but, allele frequency differences was not significant between the case and control groups (OR=0.86, P=0.47). However, it has been shown that GG homozygous in comparison to TT homozygous show an increased risk of male infertility but it was not statistically significant (OR=1.47, P=0.4). In parallel, comparison of GG + GT genotypes to TT ones was not also statistically significant between infertile and fertile men (OR=1.43, P=0.4).

**Conclusion:** Association study of polymorphic rs7192 did not show any significant relationship among men infertile with azoospermia or severe oligozoospermia in Isfahan province of Iran.

**Keywords:** Male infertility, HLA-DRA gene, rs7192 polymorphism.

**Cite this article as:** Motovali-bashi M, Akbari S, Javadirad SM. Association study of rs7192 polymorphism of HLA-DRA gene with male infertility occurrence in Isfahan province of Iran. J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20(1): 45-53.

---

**\*Corresponding author:**

Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00983137932474,  
E-mail: mbashi@sci.ui.ac.ir